

醉香含笑根皮挥发性成分的 GC-MS 分析及对 NIH 3T3 细胞生长抑制作用

宋晓凯(淮海工学院化学工程学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 目的 分析醉香含笑根皮的挥发性成分, 并考察醉香含笑根皮提取物(REMMD)对小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 的体外生长抑制作用。方法 水蒸气蒸馏法提取醉香含笑根皮的挥发性成分, 用气相-质谱联用(GC-MS)技术分析, 并用峰面积归一化法测定各成分相对含量; 采用 MTT 法检测 REMMD 对 NIH 3T3 细胞体外生长抑制作用。结果 共检出 57 个色谱峰, 确定了其中 31 种化合物, 占该挥发性成分总量的 63.31%。结论 REMMD 的挥发性成分以 *N,N'*-二苯甲酰基-庚二胺为主(28.97%), 其他成分有棕榈酸及棕榈酸乙酯(7.03%)、高香草酸(3.25%)、4-[(1*E*)-3-羟基-1-丙烯基]-2-甲氧基-苯酚(3.16%)、木香烯内酯(2.33%)、糠醛及其衍生物(2.5%)。25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 REMMD 能显著抑制 NIH 3T3 细胞的生长, 其抑制率呈浓度依赖关系, 提示其具有抗纤维化疾病的良好研究开发前景。

关键词: 醉香含笑根皮; 挥发性成分; GC-MS 分析; NIH 3T3 细胞; 生长抑制

中图分类号: R917.101; R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)12-1122-04

GC-MS Analysis of Volatile Components from Roots of *Michelia Macclurei* Dandy. and Growth Inhibition of NIH 3T3 Cell Line

SONG Xiaokai(College of Chemical Technology, HuaiHai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE The volatile components from roots of *Michelia macclurei* Dandy. were analysed, and the inhibition effects of root extract of *Michelia macclurei* Dandy. (REMMD) on growth of NIH 3T3 cell lines *in vitro* were explored. **METHODS** The volatile components from root of *Michelia macclurei* Dandy. were extracted with steam distillation method and analysed by GC-MS. The relative content of each component was calculated by peak area normalization. The inhibiting effects of REMMD on growth of NIH 3T3 cell lines *in vitro* were examined by MTT assay. **RESULTS** Fifty seven peaks were detected, in which 31 compounds were identified, which made up 63.31% of the total volatile components. **CONCLUSION** The main component in the volatile components is *N, N'*-di-benzoyloxy-heptanediamide(28.97%), other components are palmitic acid and palmitic acid ethyl ester(7.03%), 4-hydroxy-3-methoxy phenyl acetic acid (3.25%), 4-[(1*E*)-3- hydroxy-1-propenyl]-2-methoxyphenol(3.16%), costunolide(2.33%), furaldehyde and its derivatives(2.5%). REMMD with concentrations of 25, 50, 75, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly inhibit the growth of NIH 3T3 cell lines *in vitro*, therefore the results are enlightening for good researching and developing prospects of anti-fibrosis diseases.

KEY WORDS: root extract of *Michelia macclurei* Dandy.; volatile components; GC-MS analysis; NIH 3T3 cell lines; growth inhibition

醉香含笑 *Michelia macclurei* Dandy., 又称火力楠, 是木兰科含笑属的常绿乔木, 为我国特有植物, 主要分布于我国福建、广西、广东及贵州等省。其花可提炼芳香油, 树皮、根、叶可药用, 有清热解毒之功能, 种子可榨油, 作燃料用油。目前, 有关醉香含笑的化学成分及生理活性研究, 除黄儒珠等近期有关醉香含笑叶挥发油化学成分的报道外, 尚未见其他报道^[1-3]。

为系统研究其化学成分, 探讨其药用物质基础, 本实验采用水蒸气蒸馏法提取醉香含笑根皮的挥发性成分, 并用气相-质谱联用技术进行成分分析, 共鉴定出 31 种成分, 用峰面积归一化法分析测定了其相对含量; 并采用 MTT 法^[4]测定醉香含笑根皮提取物(REMMD)对小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 的生长抑制情况。为进一步开发醉香含笑植物资源的药用价值提供科学依据。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20872110)

作者简介: 宋晓凯, 男, 博士, 教授 Tel: (0518)85895408

E-mail: sxk581214@163.com

1 仪器与试剂

Trace DSQ II 气质联用仪(美国 Finnigan 公司); 质谱检索数据库: NIST 02; 所用试剂为分析纯。

醉香含笑全株植物于 2009 年 6 月采自浙江省金华市金西花木场, 经淮海工学院宋晓凯教授鉴定为木兰科含笑属植物醉香含笑 *Michelia macclurei* Dandy。

2 方法与结果

2.1 REMMD 制备及根皮挥发性成分提取

称取醉香含笑根皮 3.4 kg, 自然晾干后, 剪碎, 用工业酒精浸泡, 经回收溶媒、浓缩后得到乙醇总浸膏备用。另称取醉香含笑根皮 1.1 kg, 自然晾干后, 剪碎, 过 20 目筛, 分批于挥发油提取器中, 按中国药典 2010 年版一部附录 XD 挥发油测定法操作测定, 进行水蒸气蒸馏, 得到 1.48 g 淡黄色油状液体, 得率约为 0.14%, 供分析用。

2.2 GC-MS 分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 TR-5 MS 石英毛细管柱(30 m×250 μm, 0.25 μm); 初始柱温: 50 °C, 保持 2 min; 以 5 °C·min⁻¹ 升至 280 °C, 保持 15 min; 进样量: 1.0 μL; 进样口温度: 250 °C, 接口温度: 280 °C; 载气: He(>99.99%), 恒流: 1.0 mL·min⁻¹, 分流比 20:1。

2.2.2 质谱条件 EI 离子源, 电子能量 70 eV, 电子倍增器电压 1 140 V, 质量数范围 50~500。

2.3 REMMD 对小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 的生长抑制作用

小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 培养于 RPMI 1640 基质中(含有 10% L-谷氨酰胺的胎牛血清, 100 U·mL⁻¹ 盘尼西林, 100 U·mL⁻¹ 链霉素)。细胞被清洗后重新悬浮于上述介质中, 浓度为 5×10⁴ 个·mL⁻¹; 96 孔板中每孔加入 100 μL 细胞悬液(每孔 5×10³ 个细胞); 细胞在 5% CO₂, 37 °C 的条件下培养 24 h。分别设立 12.5, 25, 50, 75, 100 μg·mL⁻¹ 共 5 个浓度 REMMD 组、空白对照组(不加 REMMD)。用完全培养基稀释 REMMD 至上述各浓度, 然后除空白对照组外, 每孔加入 100 μL 相应的含 REMMD 培养基。

将上述 96 孔板的细胞继续培养 72 h 后, 采用改良 MTT 法来检测 REMMD 对 NIH 3T3 细胞的生长抑制情况: 20 μL 的 MTT 磷酸盐缓冲液(5 mg·mL⁻¹)加入每孔中, 在 5% CO₂, 37 °C 条件下继续培养细胞 4 h, 取出离心(1 500 r·min⁻¹)5 min

以沉淀细胞和 MTT 结晶物。离心后从每孔取出悬浮液 150 μL, 然后加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)以溶解 MTT 结晶物。平板置于微型振荡器上混合 10 min, 然后置于酶标仪上在 490 nm 测定。从酶标仪读出每孔的 OD 值, 按下式计算各浓度 REMMD 组的抑制率。加药组抑制率(%)=(空白对照孔 OD 值-加药孔 OD 值)/空白对照孔 OD 值×100%。数据为 3 次实验的平均值, 每次实验同组做 3 个平板。

2.4 REMMD 作用后细胞形态变化的观察

分别设立含有 12.5, 25, 50 μg·mL⁻¹ REMMD 的完全培养基的 3 个浓度组, 以不含 REMMD 的完全培养基为空白对照组, 按“2.3”项下第 1 段所述步骤进行操作, 培养 NIH 3T3 细胞 72 h 后, 倒置生物显微镜观察各组细胞形态变化。

2.5 结果

2.5.1 GC-MS 测定结果 按照“2.2”项下分析条件, 对醉香含笑根皮的挥发性成分进行 GC-MS 分析, 获得其挥发性成分的总离子流图见图 1。由图 1 可知, 在所用的 GC 条件下共分离 57 个峰, 通过对总离子流图进行质谱扫描和在 NIST 02 谱库中自动检索, 并对基峰、质荷比、相对丰度等方面进行直观比较, 用色谱峰面积归一化法计算各组分的相对质量分数, 初步鉴定出 31 个化合物, 各组分的名称、保留时间和相对百分含量见表 1。

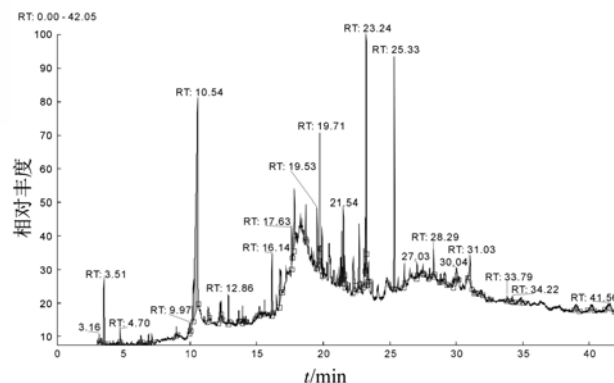


图 1 醉香含笑根皮的挥发性成分总离子流色谱图

Fig 1 Total ions current chromatogram of the volatile components from root of *Michelia macclurei* Dandy

2.5.2 MTT 测定结果 MTT 比色法结果见表 2, 各浓度 REMMD 对 NIH3T3 细胞的生长抑制呈浓度依赖关系。尤其当 REMMD 浓度为 25, 50, 75, 100 μg·mL⁻¹ 时, 从酶标仪读出的 OD 值与空白对照组 OD 值比较均有显著性差异。

表 1 醉香含笑根皮的挥发性化学成分

Tab 1 The volatile components from root of *Michelia macclurei* Dandy.

编号	分子式	名 称	峰保留时间/min	质量分数/%
1	CH ₃ NO ₂	硝基甲烷	3.16	0.27
2	C ₇ H ₈	甲苯	3.51	3.21
3	C ₅ H ₄ O ₂	3-糠醛	4.70	0.26
4	C ₂₆ H ₅₀	1, 1'-十二烷基-二-4-甲基-二环己烷	6.15	0.12
5	C ₅ H ₆ O ₂	2-羟基-2-环戊烯-1-酮	6.28	0.50
6	C ₆ H ₆ O ₂	5-甲基-2-糠醛	6.88	0.20
7	C ₆ H ₈ O ₄	2,4-二羟基-2,5-二甲基-3(二氢)-呋喃酮	7.11	0.30
8	C ₇ H ₈ O ₂	邻-甲氧基-苯酚	8.95	0.34
9	C ₆ H ₈ O ₄	3,5-二羟基-6-甲基-2,3-二氢-4 氢-吡喃-4-酮	9.95	0.51
10	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₆	N, N'-二苯甲酰基-庚二酰胺	10.54	28.97
11	C ₆ H ₆ O ₃	5-羟甲基-2-糠醛	11.34	1.12
12	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄	2-乙氧基-2-[(2-硝基苯基)胺基]-1-苯乙酮	12.26	1.91
13	C ₉ H ₁₀ O ₂	2-甲氧基-4-乙烯基苯酚	12.35	0.35
14	C ₈ H ₁₀ O ₃	2,6-二甲氧基-苯酚	12.86	0.92
15	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₃	香草醛乳糖苷	13.65	0.31
16	C ₈ H ₁₀ O ₃	3,4-二甲氧基-苯酚	13.95	0.68
17	C ₂₇ H ₅₂ O ₄ Si ₂	1,3-二(三甲基硅氧基)丙基十八-9,12,15-三烯酸酯	14.17	0.13
18	C ₆ H ₁₂ O ₆	D-甘露糖	15.20	0.28
19	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	3-叔丁基-4-羟基-苯甲醚	15.58	0.37
20	C ₉ H ₁₂ O ₄	3,4,5-三甲氧基-苯酚	16.14	2.32
21	C ₉ H ₁₀ O ₄	高香草酸	16.75	3.25
22	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	豆蔻酸	17.63	0.87
23	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	4-[(1E)-3-羟基-1-丙烯基]-2-甲氧基-苯酚	17.81	3.16
24	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	十五烷酸	18.69	1.01
25	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	反-11-十六烯酸	19.53	2.30
26	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	棕榈酸	19.71	3.55
27	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	棕榈酸乙酯	19.92	0.90
28	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	木香烯内酯	22.28	2.33
29	C ₁₅ H ₂₄ O	异香橙烯氧化物	22.69	2.31
30	C ₃₀ H ₅₂ O ₃ Si	(5E,7E)-25-[(三甲基硅)氧]-9,10-开环胆甾-5,7,10-三烯-1,3-二醇	32.47	0.17
31	C ₁₈ H ₃₅ BrO	2-溴—十八醛	34.22	0.39

表 2 REMMD 对小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 生长抑制率

Tab 2 The suppression rate of REMMD on growth of NIH 3T3 cell lines

样品	REMMD 浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	OD 值	NIH 3T3 细胞的抑制率/%
1	100	0.129 $\pm$ 0.018 ²⁾	83.64
2	75	0.162 $\pm$ 0.018 ²⁾	79.54
3	50	0.353 $\pm$ 0.055 ²⁾	55.37
4	25	0.553 $\pm$ 0.042 ²⁾	30.11
5	12.5	0.706 $\pm$ 0.011 ¹⁾	10.75
空白对照组	0	0.791 $\pm$ 0.044	-0.33

注：与空白对照组比较，¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

Note: Compared with control group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

2.5.3 REMMD 对 NIH 3T3 细胞形态学的影响

从图 2A 可见，正常情况下，NIH 3T3 细胞在培养基中贴壁生长，细胞形态扁平，无规则。当浓度为 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 REMMD 作用于细胞 72 h 后，NIH 3T3 细胞与正常细胞相比，显现出圆

形，脱壁并失去细胞连接，细胞相互断裂情况与 REMMD 的浓度相关，浓度越大，连接断裂越明显。

3 讨论

在本实验中，已鉴定成分占挥发油总量的 63.31%。从表 1 中看出，含量较高的是 N,N'-二苯甲酰基-庚二胺(28.97%)、棕榈酸(3.55%)、高香草酸(3.25%)、4-[(1E)-3-羟基-1-丙烯基]-2-甲氧基-苯酚(3.16%)、木香烯内酯(2.33%)、异香橙烯氧化物(2.31%)等。苯酚类约占 12.27%，棕榈酸及棕榈酸乙酯约占 7.03%，糠醛及其衍生物约占 2.5%。

其中，木香烯内酯为吉玛烷型倍半萜内酯结构，具有较强的抗肿瘤活性^[5-6]。

纤维化有关疾病是许多疾病脏器损伤的结果，如肝纤维化、肺纤维化、真皮纤维化等。目前，国内外公认、作用良好且方便的抗肝纤维化药物体外筛选模型为鼠来源的成纤维细胞株，即 NIH/3T3 细胞^[7]。

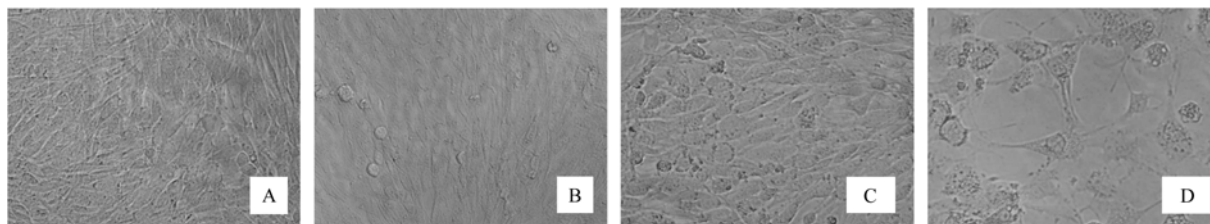


图2 REMMD 对小鼠成纤维细胞 NIH 3T3 的生长抑制作用(400×)

A-空白对照组; B-12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; C-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; D-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD

Fig 2 Inhibition effect of REMMD on growth of NIH 3T3 cell lines(400×)

A-negative control group; B-12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; C-25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD; D-50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ REMMD

本实验以小鼠成纤维细胞 NIH/3T3 为靶细胞, 采用 MTT 法观察 REMMD 对其生长的抑制作用, 并观察 REMMD 作用后对其形态变化的影响。结果显示, REMMD 可显著抑制 NIH/3T3 细胞生长, 呈浓度依赖关系。体外实验数据表明其具有一定的抗纤维化作用, 作用机制有待进一步探讨。这对于进一步开展 REMMD 抗肝纤维化的动物体内实验具有指导意义。

致谢: 醉香含笑地下部位的挥发性化学成分 GC-MS 分析由扬州大学分析测试中心陆春良老师协助完成, 在此致谢。

REFERENCES

- [1] ZHONG Y H. Cultivation technique of *Michelia macclurei* Dandy. [J]. Guangxi Forest Sci(广西林业), 2005(4): 42-43.
- [2] MING J, GU W C. Research advances on *Michelia* Linn. in China [J]. J Cent South Forest Univ(中南林学院学报), 2004, 24(5): 147-152.
- [3] HUANG R Z, TAN D F, ZHENG Y S, et al. Chemical constituents of the volatile oils from leaves of *Michelia macclurei* Dandy [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2009, 17(4): 406-408.
- [4] SARGENT J M, TAYLOR C G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia [J]. Br J Cancer(英国肿瘤杂志), 1989, 60(2): 206-210.
- [5] SONG X K. Studies on the chemical constituents and bioactivities of *Tsoongiodendron odorum* Chen.[D]. Shenyang: Shenyang Pharm Univ, 2001.
- [6] SONG X K, WU L J, TU P F. Studies on bioactive constituents in bark of *Tsoongiodendron odorum* Chen. [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2002, 33(8): 676-678.
- [7] LIU C H, HU Y Y, WANG X L, et al. Effects of salvianolic acid-A on NIH/3T3 fibroblast proliferation, collagen synthesis and gene expression [J]. World J Gastroenterol(世界华人消化杂志), 2000, 6(3): 361-364.

收稿日期: 2011-04-13